

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公報番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月20日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/08		9161-4B	
C 07 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	C 12 N 15/00 Z N A A
			審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全17頁) 最終頁に続く

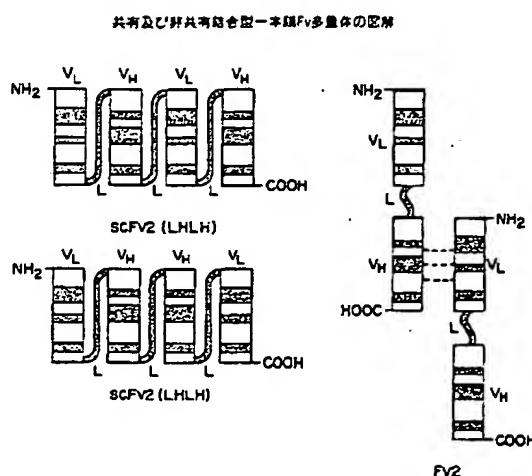
(21)出願番号 特願平6-514437
(86) (22)出願日 平成5年(1993)12月10日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日
(86)国際出願番号 PCT/US93/12039
(87)国際公開番号 WO94/13806
(87)国際公開日 平成6年(1994)6月23日
(31)優先権主張番号 990, 263
(32)優先日 1992年12月11日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー
アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッ
ドランド, アボット・ロード, ダウ・セン
ター 2030
(72)発明者 メゼス, ピーター・エス.
アメリカ合衆国, コネチカット 06371,
オールドライム, シル・レーン 25
(72)発明者 ゴーリー, ブライアン・ビー.
アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッ
ドランド, オーチャード・ドライブ 3713
(74)代理人 弁理士 石田 敬(外3名)

(54)【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57)【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を
有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖
抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチ
ドリンクーを用いることによって作った。各一本鎖抗体
は、ペプチドリンクーにより、可変重鎖ドメインに連結
されている可変軽鎖ドメインを有する。



特表平7-503622 (2)

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと
連結せしめる第二のペプチドリンカー；
を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

抄書(内容に変更なし)

請求項の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは：

- (a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Ile Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは：

- (a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

抄書(内容に変更なし)

明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応答して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその亜合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV₁及びV₂と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えは、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は既

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビオ治療及び診断にとってのネズミ抗体の役とは、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換DNA方法論により作られている。例えは、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 899-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その高活性力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体様分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが望まれる。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV₁と一本のV₂とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

特表平7-503622 (3)

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；
を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；
を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構造を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が 2 種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構造も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_L-L-V_n-L-V_L-L-V_n$ (LHLH) と $V_L-L-V_n-L-V_n-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 Pv 一本鎖抗体 (Pv2) を示す。

図 2 は CC49V_n のヌクレオチド配列を示す。

図 3 は CC49V_n のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V_n のヌクレオチド配列を示す。

図 5 は CC49V_n のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 7 は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL301T 及び pSL301HT の構造を示す。

図 9 はプラスミド p49LHLH の構造を示す。

図 10 はプラスミド p49LHHL の構造を示す。

図 11 は CC49IgG, CC49scPv2 及び CC49scPv を用いた、融合因子としてビオチニル化 CC49IgG を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

複数、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらは IUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scPv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 V_L-L-V_n により表わされる、ペプチドリンカー (L) により V_n ドメインに連結された V_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_L と V_n ドメインとの順序は逆であってよく、 V_n-L-V_L として表わされるポリペプチドが獲得できる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_n-L-V_L-L-V_n$; $V_L-L-V_n-L-V_n-L-V_L$; $V_n-L-V_L-L-V_n-L-V_L$;
又は

$V_n-L-V_L-L-V_L-V_n$

の V_L と V_n ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド調リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 V_L と V_n ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_n-L-V_L-L-V_L-L-V_n$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_n-L-V_n$

で表示されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_n-L-V_L-L-V_n$ (LHLH) 及び $V_L-L-V_n-L-V_n-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図 1 に示す。非共有結合型 Pv 一本鎖抗体 (Pv2) も図 1 に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の種類及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その種類と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された Kabat らの Sequences of Proteins of Immunological Interest 第 4 版 (1981) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

特表平7-503622 (4)

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログ ATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及び他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できうる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好適にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は課題の抗原であるか、又はハブテンであるとき、キーホールリソベットヘモシアニン(KLE)の如きの抗原に対するこのハブテンの抗原性抱合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2~3週間までの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されうる。通常、最後の負荷の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できうるようハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する单独細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV_l及びV_hドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 90/04410及び1986年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

おいてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV_l及びV_hドメインである。CC49のV_lをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV_hのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV_hをコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV_hをコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリソルバーを得ることが必要である。V_lとV_hドメインを連結するための適当なリソルバーは、V_lとV_hドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリソルバーは、各イムノグロブリンフラグメントのV_l及びV_hドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリソルバーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できうる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをニードする遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、V_lとV_hドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリソルバーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリソルバーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

する。

そのリソルバーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリソルバーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリソルバーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10117-10125(1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリソルバーを基盤とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXba I部位と、他端にあるHind III部位により指定されるコドンを理由に変えられている。

好適なリソルバーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリソルバーは一般に10~50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリソルバーは16~30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリソルバーは12~30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリソルバーは15~25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレブリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レブリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E. coli)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S.セレビジエ(S. cerevisiae)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(Pichia pastoris)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスマドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC): pSVL及びpKSV-10(Pharmacia), pBPV-1/pML2d(International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構造体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集積過程とつり合う。レブリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集積及び折りたたみを助長するために必要とされうる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

特表平7-503622 (5)

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換DNA技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、実験生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この意図において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分離されるなら、この一本鎖の多価抗体は紫外線により縮締されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで紫外線、抗原アフィニティーコロマトグラフィー又はイオン交換コロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル滲過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体(refractive bodies)、通常封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を崩壊するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HClによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに純く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)により測定できうる。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構成されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な医療組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の医療組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略語

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	[1, 3-ビス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖Fvダイマー

IEF	等電点電気泳動
Kb	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani培地
MaB	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴタクレオチド
PAC	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
psCPV	CPVをコードするDNA配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドテシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)
TTBS	ツイーン20洗浄液
V _l	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V _u	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン
抗体	CC49: ヒト腫瘍関連タンパク質72(TAG-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

CC49PAB: 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scFv: ベブチドリンクーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Pv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後の数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンクーにより連結されている、2本のCC49ドメインと2本のV_lドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_l(L)とV_u(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHHL, LHLH, LLHH, HLLH, HLRL及びHHLH。

プラスミド

psCPV_UHN: 25のアミノ酸リンクーにより連結されている、CC49の可変領域とCC49可変重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH又はLHHL生成物のそれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することを本明細書に組入れる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版(1989)及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴタクレオチドの合成及び精製

オリゴタクレオチド(オリゴ)は全て、標準のβ-シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいづれかで合成した。その生成物上の保護基は、温水酸化アンモニウムの中で55°Cで8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバボレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40μlの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1μlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65°Cで2時間かけて溶離させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標)C-18カラム (Millipore, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶離することによって行った。その溶離の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD₂₆₀) での光学密度を測定することにより決定した。

新規酵素消化

新規酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN) の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムプロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Union Carbide Corp., Chicago) の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置 (Hoefer Scientific Instruments,

CA) を用いて透析させた。サンプル容量を Speed Vac濃縮器 (Seavant Instruments, Inc., NY) で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850~857 (1986)に実質的に記載の通りに調製した TAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイターブレート (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのブレートを PBS中の1%の BSAで31°Cで1時間ブロッキンし、次いで200μlの PBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25μlの試験抗体及び25μlのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのブレートを31°Cで30分インキュベートした。ブレートに結合した TAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールは PBS中の1%の BSA及び/又は滅菌LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) を加え、そしてそのブレートを31°Cで30分インキュベートした。そのブレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation, Manlo Park, CA) を用い404~450 nmでの光学密度スキャニングに

より測定した。scFv2の場合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル (20μl) を、非還元用サンプル調製バッファー (Seprasoil 1 (Integrated Separation Systems (ISS), Natick, MA) の中に5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド (Daiichi Minigel) にその製造者の仕様書 (ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置 (ISS) を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており (Mid Range Kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタメートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドライザ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュブリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファー#1 (0.3Mのトリス-HCl, pH 10.4) の中で15~20分平衡にした。Immobilion-P, PVDF (ポリビニリデンジクロリン) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファー#1の中へ3分平衡にした。Milliblot-SDS装置 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一度の陽極バッファー#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 連続のシートを陽極バッファー#1の中に浸し、そしてその電

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファー#2 (25mMのトリス、pH 10.4) の中に浸した別の連続を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファー (40mMのグリシン中の25mMのトリス-HCl, pH 9.4) の中に浸した連続のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定常電流 (初期電圧は8~20ボルトに範囲した) を用いて30分で達せられた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング液 (トリス緩衝食塩水 (TBS) 中の1%の牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, St. Louis, MO)) を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL) より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロッキンし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液 (TTBS) を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20 (Sigma) をTBSのリッター当たり混ぜた。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化 FAID 14溶液とした (10μg/20mlの抗体バッファー)。抗体バッファーは100mlのTTBS当り1gの BSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファーの中で1:500 希釈率のアルカリホスファターゼの結合されたストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファー (20ml) の中で2分洗った。このバッファーは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂、H₂O、pH 9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

ての基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウエスタン免色剤として市販されている。免色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで免色液からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC48に対して特異的な、ATCC No.CRL10256として寄託されているネズミの抗イディオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14を Nygene Protein Aアフィニティカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただしどのバッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。蛋白を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH~7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa₂CO₃、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノカプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Supercase 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル通過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化 FAID 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する蛋白をブーリし、そして4℃で保存し、そしてCC48V_t及びV_nCDRにより決定

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEFプレート、pH域3~10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシニアニン、β-ラクトグロブリンB、牛皮膚アンヒドライゼ、ヒト炭酸アンヒドライゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レントチルレクチン及びチトクロームCを含み、それとのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、FMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC48抗体の定量

IgG, scPv2の種および単量体scPvを含む精製CC48抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS 分光光度計E552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E₁)は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_1 = (Trp \text{数}) \times 5,500 + (Tyr \text{数}) \times 1,340 + ((Cys) 2 \text{数}) \times 150 + (Phe \text{数}) \times 10$$

これらの値は、D.B.Wattauer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~376頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC49scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全量にチタンまたはテフロン製配管を用いた LKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定された UV CORD SII 2236型検出装置および2211型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド様の(pSCFVUHM) : 100ピコモルのプライマー: 1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在のPBC社)のAmpli-Tagポリメラーゼ: 16μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPEKキットに提供されている);ならびに合計容積を100μlにするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性: 52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴタクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の390A型もしくは391型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E.coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由來のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を経ながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFVUHM, p49LHLHもしくはp49LHHHLに用いる20μg/mlのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由來のその後の構築物に用いる100μg/mlアンビシリソ(CAMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニーブレッッププラスミド製造キットを用いて、海太圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの複数

p49LHLHおよびp49LHHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために精製した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V_t-L-V_t-L-V_t-L-V_tで表すことができるポリペプチドを產生した。ここでV_tとV_sはCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記 SEQ ID NO: 5の配列を有する

特表平7-503622 (B)

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Asp

p48LHHLを含有する宿主細胞は、V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄で表すことができるポリペプチドを产生した。ここでV₁とV₂はCC48抗体の領域と重複の可変領域であり、およびV₃は上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC48V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄(p48LHHL)のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC48V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄(p48LHHL)のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301HTの構造

pSL301HTの構造を図8に示す。バシラス・リヘニファルミス(Bacillus licheniformis)のペニシリナーゼP(pepP)ターミネーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取り出、電気泳動を行った後、4.5%ボリアクリルアミドゲルから切取り、電気溶出させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター:pSL301(米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許第07/935,695号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCFV UHMは、pepPプロモーターのタクレオチド配列:固有NcoI制限部位:CC48V₁領域: HindIII制限部位:25個のアミノ酸のリンカー:固有XbaI制限部位:CC48V₂領域: NheI制限部位:pepPターミネーター;およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpepPプロモーターとpepPターミネーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

SCP5: 5'-TAAA GCT ACC ACCA ACCC CCT TAG TCA CGA GAC GCT GAC TGA CGT-3'

下線をつけた部分はエンドオクレアーゼ制限部位を示す。

培養されたV₁DNAを、4%のPAG、電気溶出、エタノールによる沈殿および20μL水への溶解によって精製した。そのV₁配列をXbaIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いで精製されたpSL301HTベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピテンント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC48V₁インサートを含有していることを示す候補的クローニングをNheIおよびXbaI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB)社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、XbaI部位から57bp上端においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC48V₁の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC48V₁配列を有するクローニングを明らかにした。このプラスミドはpSL301-RHHLおよびpSL301-HLHTの両者を精製するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをこに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12)およびCC48V₁(SEQ ID NO: 13)のオリゴタクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC48V₁: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

実施例1 p48LHHLの構造

pSL301HT(5μg)を出発物質として用い、これをEco47IIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC48V₁挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCP7bを用いかつ

11211~11218頁、1993年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜培養させたコンピテンント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。pepPターミネーター、インサートを含有するボテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサーズバーグ所在)のT7 QuickprimeTMP DNA保証キットと、Boluwelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1999年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解放をともに用いてスクリーニングした。プローブは、pepP-NheI-BamHIターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301HTと命名し、次いでCC48V₁に対するタクレオチド配列を含有するpSL301HTを精製するに選択した。NheI-BamHI pepPターミネーターをpSL301HT中に配した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のポリリンカーネオ領域中に存在するEco47II制限エンドオクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47II部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV₁とV₂の領域を統合して構築するため設計された。各V領域がEco47II-NheI部位に附加されると、Eco47IIは各場合に破壊され、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47II部位を形成した。

V₁配列は、PCR增幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3'オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP6B: 5' -TAAA TCC CCA GAT GAC CCA AGC AAA GAC CCA CCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AGG GAT GAC GGC AGG AAA GAT CTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG
TCT-G'

またオリゴ SCP6Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp 8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC48V₁領域でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIとNheIで消化し次いでpSL301HT Eco47II-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテンント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(8μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXbaI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSCP1を用いて決定し、正しい配列(図7のタクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV₁サブユニット(bp1544~1963、図7)は、5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TCC CCA GAT GAC CCA AGC AAA GAC CCA CCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AGG GAT GAC GGC AGG AAA GAT CTT GAG GTT CAG ATG TCA CAG TCT
CC

下線をつけたタクレオチドは *Fsp*I 部位である。 SCP8aのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC
 CAG CTT CGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は *Nhe*I 部位に相当し、もう一つの組は *AfI* II 部位に相当する。 SCP70のタクレオチド8~76はリンカーをコードし(図7のタクレオチド1544~1612)、一方 V_L にアニールするタクレオチド77~89は図7の1613~1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短かいテール、 *Nhe*I 制限部位、終止コドン、 *AfI* II 制限部位および V_L の最後の21個の塩基を含有している。 *Fsp*I と *Nhe*I による消化の後、この得られた420bpのインサートを精製して精製pSL301HHLベクターの *Nhe*Iと *Eco*47IIIの部位に連結し、候補的なクローニングを *Nhe*Iと *Xba*Iでスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2 (-)とSOP1で配列が決定されて、 pSL301HHL中に新たに挿入された配列が確認された。そのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

49LFR2 (-) : 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL301HHLを *Xba*I および *Nhe*Iで消化し、精製し、得られた1178bp V_L - リンカー - V_L - リンカー - V_L セグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHLHを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリガーゼ反応生成物(4μL部分)を用いてコンピテンント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、

LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地区を有するプラスミドを含有する単クローニングを、 p49LHLHを含有させるために選択した。 p49LHLHは、 CC48多価一本鎖抗体 scFv2: V_L -L- V_L -L- V_L またはCC48scFv2 (LHLH)のpenPプロモーターとタクレオチ

ド配列を含有している。

実験例2: p49LHLHの構造

p49LHLHの構造を図11に図式的に示す。リンカー- V_L のサブユニットを5'オリゴの SCP7bと3'オリゴのSCP8で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
 ACC ACC ACC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(タクレオチド8~76)は図6のリンカーをコードし(タクレオチド1124~1192に相当する)および図6の V_L のタクレオチド1193~1215に相当する、 PCRに対する pSCPV UHM標的(タクレオチド77~89)にアニールした。

SCP8は、 *Nhe*I 部位(第一の下線をつけたタクレオチド)と *Eco*47III部位(第二の下線をつけたタクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL301HHLを作るのに必要な制限部位である。SCP8のタクレオチド18~23は図6のタクレオチド1532~1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方タクレオチド24~46は、 PCRにおけるSCP8のアニーリング領域である図6に示すタクレオチド1508~1531に相当する。プラスミドpSL301HHLを *Eco*47IIIと *Nhe*Iで消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め *Fsp*Iと *Nhe*Iで処理され精製された、 PCRからのリンカー-CC48V $_n$ DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μL)を用いて大腸菌AG1コンピテンント細胞を形質転換し、次いで正しい *Xba*I - *Nhe*Iの大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HHLクローニング中に PCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるタクレオチド1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がまとめられ、そしてTであるべきはずのタクレオチド1531は DNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCCCTT...であった。

ここで下線をつけた配列は偶然に *Eco*47III部位を形成した。図6のAGCCCTの配列はタクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴ SCP8Cの末端に5塩基の欠失を組み込むことによってpSL301HHLTを精製した。

SCP6C: 5' -TAA GCGCTGATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA
 GGACGACGGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG
 AGCTTCAGTTCAGCAGCACTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列は *Eco*47III部位に相当する。 PCRにおいて、 SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方 SCP10は3'オリゴとして用いられて、 リンカー-CC48V $_n$ セグメントが生成する。

SCP10のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 28)は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TCC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
 CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のタクレオチド1558~1563に見られる *Nhe*I 部位に相当する。この場合、 PCRインサートは *Nhe*Iだけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL301HHLT)は *Eco*47III部位(先に形成されている)および *Nhe*I部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μL)を使ってコンピテンント AG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローニングを *Xba*Iと *Nhe*Iでスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローニングを得た。これらのクローニングのうちの2個は、オリゴ49VLCDR3 (+) およびSOP1を用いて配列を決定した。そのタクレオチド配列(49VLCDR3 (+) の DWQ ID NO: 24)は下記のとおりである。

49VLCDR3 (+) : 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローニングが得られ、そして図6のタクレオチド1533~1563からの配列が確認され、正しいpSL301HHLHクローニングを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを精製するために、 pSL301HHLT(5μg)を *Nhe*Iと *Xba*Iで消化し、次いで V_L -L- V_L -L- V_L 配列を有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、 pSCPV UHM(5μg)を *Xba*Iと *Nhe*Iで消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μL)を使ってコンピテンント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する代表的なクローニングを、正しい制限酵素地区(図10参照)およびTAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実験例3 CC48 scFv2のLHLHとLHLHが共有結合した二量体の精製

CC48の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の回分を、 p49LHLHと p49LHLHの両者の1.0Lの一夜培養物から精製した。要約すると、培養物を250mLづつの4部分に分割し、 Sorvall GS-8ロータで10分間 5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、 30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100mL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mLの30mMトリス-HCl pH 8で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、 40W/v%

特表平7-503622 (10)

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5mM MgCl₂中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら水上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の面分を含有する上皮細胞を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentriprep 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショケート(shockate)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 HPLCカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性区分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回交換しながら80000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アニオニン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の面分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマーシーブリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析(プローブ抗体としてビオチニル化PAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性区分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオニン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの面分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの面分は実際にはカラムに結合していないかったわけである。次いで面分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S面分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.6mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで溶出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

精製物の等電点(pI)はDNASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のコンピュータプログラムProtein-Titratorを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC Bioproducts社(米国、メイン州、ロックランド所在)のIso gel IEFプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEFを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチャモンド所在)の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V(度定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEF標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドライゼ、ヒトカルボニックアンヒドライゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65、5.10、6.00、6.50、7.00、7.50、7.8、8.00、8.20および8.6であった。ゲルはFMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTARプログラムによって両方のscFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し单一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の6.9の位置にみとめられた。

IgG、scFv2(LHLH)および(LHHL)のよう精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光的に測定することによって定量した。モル吸光係数E₁は各々、先に引用したWetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG、CC49scFv2LHLH、CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvのE₁%(280nm)値はそれぞれ1.49、1.65、1.65および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単体量scFvと比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合} - \text{試料競合}}{\text{ゼロ競合} - 100\% \text{競合}} \times 100$$

*ゼロ競合(zero competition)値は、1% BSAをビオチニル化CC49(3×10~14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図IIに示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競合値の平均値を使

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10モルの結合部位/孔で塗布した。ビオチニル化CC49(4μg/μL:1:20,000に希釈、25μL使用)で試料を1/2濃度に希釈した。透析希釈法(1:2)を行った。両方の形態のscFv2はIgGにはやや多い(図II参照)。別の試験で、CC49scFv単体量をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティがやしいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単体量の種に比べてIgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの親と同様に、免疫治療用の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多量回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施例は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の実の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

抄書(内容に変更なし)

FIGURE 1

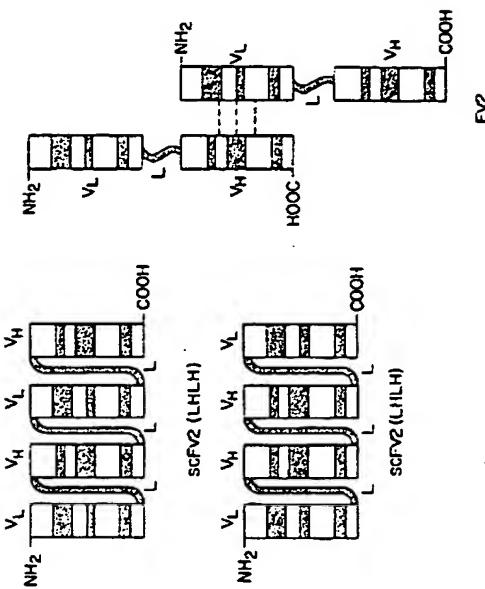
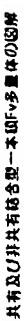


FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GCC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
GCG CTC GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA ATT CAT
GAT TTT AAA TAC ATT GAG AAC TTC AAC GGC AAC GCA ACC CAA CTC
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC CTC AAC
AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA
TCC CTC ATT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Gin Leu Glu Gin Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 Asp Ser Ala Ile His Trp Val Lys Cln Asn Pro Glu Gin Gly Leu
 Glu Trp Ile Gly Tyr Asp Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr
 Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 Ala Val Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
 Gly Glu Gly Thr Ser Val the Val Ser Ser

FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC ACT CAG AGC
CTT TTA TAT AGT GGT ATG CAA AAG ACG TAC TTG CCC TGG TAC
CAG CAG AAA CCA CGG CAG TCT CCT AAA CTG CTC ATT GAT TAC TGG
CCA TCC GCT AGG CAA TCT GCG TCC CCT GAT CGC TTC ACG AGC
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC ACC TTC CGT GCT GGG ACC AAG CTC CTG CTG CTG
AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Cln Ser Pro Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 Ala Gly Lys Leu Val Leu Lys

FIGURE 6

5'-C TCA TCA TCG TCG ACA GCT TAT CAT CGA TCA ATT CCA TCA CTT CCC TCC	46	Ecot 1	Ecot 1
CTT CAT TTC TCC CGG GTG GAA AGG TCA TCA TTT CCT TCC GAA AAA	94		
ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT	142		
TGT AAG ATT TCA TGT TTO AAT CGG CGG AAA GAT CGT AGC TAC CAA TTA	190		
TTG TTT CGT GAT TGT TCA AGC CAT ACT GAA AGC TAA GTC CAA AGA	238		
CTG CTT CAT CTG GTT AGC ATC ATT CAA ATA TGC AAA CGG AGG GCG ACC	286		
PENFRS- TAT AAG TTT GCC TCC CTC TCG TCA TTA TTA	334		
-22			
Met Lys Tyr Leu Pro Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu			
ATT TTG ATG AAA TAC TCA CTA CTC CCT ACC GCA GCC GGT GAA TGG TTA TTA			
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp The Val Met Ser Gln Ser Pro	10	Meo 1	VL
CTC CCT GCT GGG CAA TCA GTC GTC ATT GTC GTC ATT GTC ATT CCT			
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp The Val Met Ser Gln Ser Pro	20		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Val Val Gly Glu Lys Val The Leu Ser Gln Lys	30		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	40		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	50		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	60		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	70		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	80		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	90		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			
Ser Ser Gln Ser Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser Gln Ser	100		
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC TCA GTC ATT GTC ATT GTC ATT CCT			

FIG. 6D

110. 30		210		310		410		510		610		
Pho	Cys	Thr	VH9-J	G	Ala	ATG	GCC	TAC	TGG	GCT	CAA	C
TTC	TGT	ACA	ACA	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	TTC	TCT	GAT	Ser
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370
Val	Val	Ser	Leu	Ser	Ala	Asp	Ala	Lys	Asp	Ala	Asp	Ala
CTC	ACC	GTC	TCC	TCA	CTA	AGC	GCA	GAT	GAC	GAA	GAC	GCC
Lys	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Asp	Leu	Asp
AAA	AAA	GAC	GAT	CCC	AAA	AAA	AAA	GAC	GCC	AAA	GAT	GCT
Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Gly	Gln
GIG	ATG	TCA	CAG	TCT	CCA	TCC	CTA	GTC	TCA	GTC	GAG	AAG
350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Tyr	Ser
GTT	ACT	TTC	AGC	TGC	AGG	TCC	TAT	TTC	TAT	TAT	GGT	ATG
390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510
Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Lys	Pro	Gln	Ser
CAA	AAU	AAC	TAC	TTC	GCC	TGC	TTC	CGC	CGC	CGC	CGC	AAU

FIG. 6B

100

330	Leu Leu Ile Tyr Itp Ala Ser Ala Asp Glu Ser Gly Val Pro Asp AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGC GTC CCT GAT	340	
350	Asp Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser CCC TTC ACA GGC ACT GCA TCT GCG ACA GAT TCC ACT CTC TCC ATC AGC	360	
370	Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Glu Glu Tyr Tyr ACT GTC AAC ACT GAA GAC CTC GCA TCT TAC TGT TAC TGT TAC TGT	380	
380	GCG TAT	390	
390	Ter Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Ile Lys Lou TAT CCC CTC AGC TTC GGT GGG ACC AAC CTG GTC AAG CTA	400	
400	Asp Asp Asp Ala Lys Asp Ala Lys Asp Ala Lys Asp Ala Lys GTC GAT GAT GCT AAG AAC DAC GGC GCA AAA AAC GAC GAC GCA AAA	410	
410	Asp Asp Asp Ala Lys Asp Leu Val Ile Ser Gly Val Gln Ser Asp GAG GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAC GTC CTC AAC ATT TCC TCC AAC CCT	420	
420	VH	430	
430	Glu Leu Val Lys Asp Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala GAG TGT GTC AAA CCT GGG GCT TCA GTC AAC ATT TCC TCC AAC CCT	440	

۲۵

YH 1	140	Asp Leu Val Gin Leu Gin Ser Asp Asp Gln Ser Val Lys Pro	150	
		AC CTC GAG GTT CAG TCT CAG CAG AAA CCT		814
	160	Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Tyr Thr Phe Thr		
		GCG GCT CTA GTO AAC ATT TCC TGC AAC GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT		862
	170	Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Leu Glu	180	
		GAC CAT GCA ATT TAC TGG AAC AAC GAC AAC CCT GAA CAG GCA GAG		910
	190	Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Gln Asn Asp Gln Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Glu	200	
		TGG ATT GCA TAT TTT TCT CCG GCA ATT GAA ATT GAT GAT TAA TAC AAT GAG		958
	210	Arg Phe Lys Gln Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr		
		AGC TTC AAC GGC AAG GCC AGC CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT		1006
	220	Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr	230	
		GCC TAC GTC CAG CTC AAC ACC CTC AAC TCT GCA TCT GCA GTC TAT		1054

摘要(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC99 V-L-VH-L-VH-L-VL-DNA/RUP³-ノ酸配列

5'-C TCA TCT TCG ACA GCT TAT CAT CGA TCA ATT CCA TCA CTI CCC TCC 46
GTT CAT TTG TCC CCG CTC GAA AGC TCA TCA TTG CCT TCC GAA AAA 91
AGG GTC GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAC TAC TTC AAA GAC TAC ATT 142
TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CGG CTG AAA GAT CCT ACC TAC CAA TTA 190
TGG TTT CCT GAT TGT TCA AGC TGT AGC ACT GCA ACT GTC GAA GAA 238
GTC CCT CAT CTG CTC GTC AGC ATC AAT CAA TTC AAA CGG AGG GAG AGC 286
PENP2-TAT AGG TTG TCC CTC TGT 282
-22 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu 334
Leu Ala Glu Pro Ala Met Ala Asp Tle Val Met Ser Glu Ser Pro 382
CTC GTC CCA CCA CCC ATG GCC DAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA 10
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Glu Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys 20
TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC GAG AGG ATT ACT TGG ACC TCG AAG 430.

FIG. 6F

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gin Asn 450
TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC 1726
460 Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Oly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp 470
CCT GAA CAG GGC CTC GAA TCG ATT GCA TAT TTT CCT CCC GAA ATT GAT 1774
Asp Phe Lys TTT Asp Glu Arg Phe Lys Oly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 480
GAT TTT ATT AAC TAC ATT GAA AGG TTC AGG GGC AGC CTC ACT GCA 1822
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gin Leu Alan Ser Leu Thr Ser 490
GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC CTC AAC AGC CTC AGA TCT 1870
Itp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser *** NH₂ 500
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA TAA AAA GCT AGC GAT 1966
510 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr 520
GAC CAT TCT GCA GTG TAT TCC TGT ATT ACA ADA TCC CTC AAT ATG DCC TAC 1918

FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA AGA TCA TCT TAC ATA AAC TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014
TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT TAT TCC AGT PEPNPSEQ2-0 TAT TCC AGT 2052
CAT ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TCT ATC TTT 2062
AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC 2110
GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG GGG ATT GGG TTC GAT TGT GAC AAA ATT 2158
BamH I
CCG ATC C-3'

FIG. 7B

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala 30
TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT ATT CAA AAG ANC TAC TGG GCC 478
Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Trp 50
TGG TAC CAG CAG AAA CCA CGG CAG TCT GTC ATT TAC TGG 526
Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gln Val Pro Asp Arg Phe Thr Gln Ser Gly 60
GCA TCC GCT AGG GAA TCT GCG GTC CCT GAT CGC TTC AGA GGC AGT GGA 574
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp 70
TCT GGG AGA CAT TTC ACT CTC TCC ATT AGC AGT GTC AGG ACT GAA GAC 622
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe 90
CTG GCA CCT TAT TAC TGT TAC TGT TAT AGC TAT ACC TAT CCC CTC AGG TTC 670
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp 110
GGT GCT GGG ACC ACC AAC CTC GTC GTG CTC AGG CTT AGT GGC GAT GCG AAA 120
Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Ala Lys Asp Asp Ala Lys 130
TTC CTA CGA CGC TTC TCC TCA TAA TGT TCC TGT TCC TGT TCC TGT TCC TGT 166

FIG. 7E

380	Ser Leu Alan Met Ala Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Ser Val Thr Val Ser	390
	TCC CTC AAC ATT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC	1534
400	Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp	400
	TCA CTC AGC CCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT	1582
410	Asp Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Lou Asp Ile Val Met Ser Gln	410
	GCC AAA GAG GAT GAC GGC AAG AAA GAT CTT GAC ATT ATG TCA CAG	1630
420	Ser Pro Ser Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Asp Thr Lou Ser	420
	TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC GAG AAG GTC ACT TTC ACC	1676
430	Ser Pro Val Ser Val Ser Val Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln	430
	Val Ser	430
440	Ser Gln Ser	440
	Val Ser	440
450	Asp Gln Asp	450
	TTC AAC TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT ATT CAA GAG TCT	1726
460	Leu Alan Tyr Tyr Gin Gin Lys Pro Gln Gin Ser Pro Lys Leu Leu Ile	460
	TTC GGG TCC TAC CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTC CTC ATT	1774
480	Leu Ser Alan Ser Alan Ser Alan Ser Alan Ser Alan Ser Alan Ser	480
	TTC TGT TCC GCA TCC GCT AGG GAA TCT TCT GGG CCC CCT GAT	1822

FIG. 7C

ELE 7E

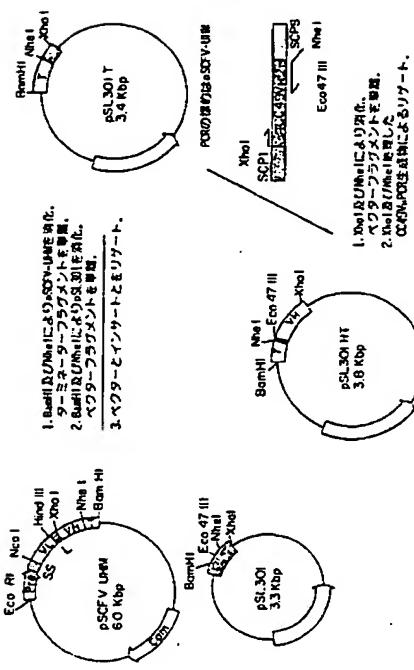
<pre> 490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser 11e Ser Ser Val Lys Thr 491 ACT GCA TCT GGG ACA TCC TCC ATC CTC TCC ATC AGT GAG AAC ACT 492 Gln Asp Leu Ala Val Phe Val Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Pro Leu 493 GAA GAC CTG GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAG TAT AGC TAT CCC CTC 494 GAA GAC CTG GCA GTC TAT TAC TGT CAG CAG TAT AGC TAT CCC CTC 495 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys *** Nhe I 496 ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTC CTT AGT TAA AAA GCT AGC GAT 497 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATG AAC TCA CTT GGT GAT CAA GCT 498 SP-1- TGT AGT AGA ATG TAT TAC AGT GAA CCA GIA GTT 499 PEPTIDE SEQ- Q TAT TAC AGT GAA CCA GIA GTT 500 CAT ATG ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TGG TTT TCT ATC TTT 501 AAA GAT CAT GTC AGG AAA AAC GCG AAA ATC CTT CTC CGG GAA AGG ACC 502 GGGG TTT TTC TCG AAA TCA TAG UGG AAT CGG TGT GAC AAA ATT </pre>	<i>BamH 1</i> <i>CCGG ACC C-3'</i>
---	---------------------------------------

FIG. 7D

250	Val Thr Ile Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala	260	Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp Ala Ala
	GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA DAT GCA AAG AAA GAC GCA GCT	270	Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Asp Ala Ala
	AAA AAA GAA GAC GAT GCC AAA AGC GAT GAC GGC AAG AAA GAT GCT GAA GCT	280	VH
	Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val	290	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	CAC TGC CAA GCG TCC GAC GCT GAC GCT GAC TGC AAA CCT GCG CCT TCA	300	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	Lys Ile Ser Gln Gln	310	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AAG ATT TCC TGC TAC GCT TGT GCT TGC TAC TGC ACT GAC CAT GCA ATT	320	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC ATT TCC TGC TAC GCT TGT GCT TGC TAC TGC ACT GAC CAT GCA ATT	330	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	340	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	350	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	360	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	370	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	380	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	390	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	400	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	410	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	420	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	430	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	440	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	450	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	460	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	470	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	480	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	490	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val
	AGC TGC GTC AAA CAG AAC CCT GAA CGC GGC CTC ATT GGA TAT	500	Val Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val

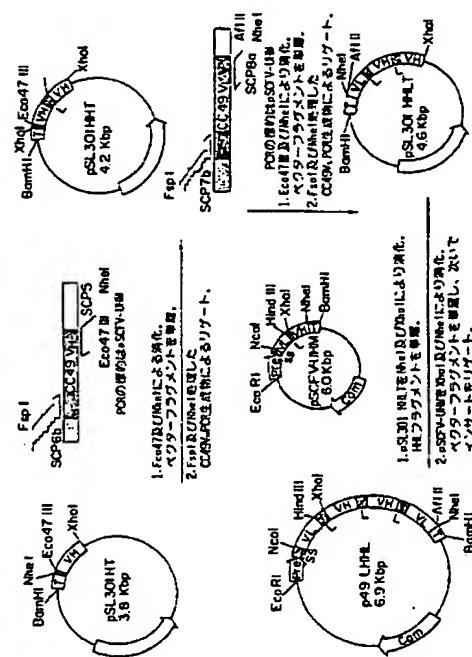
抄録(内容に変更なし)

FIGURE 8



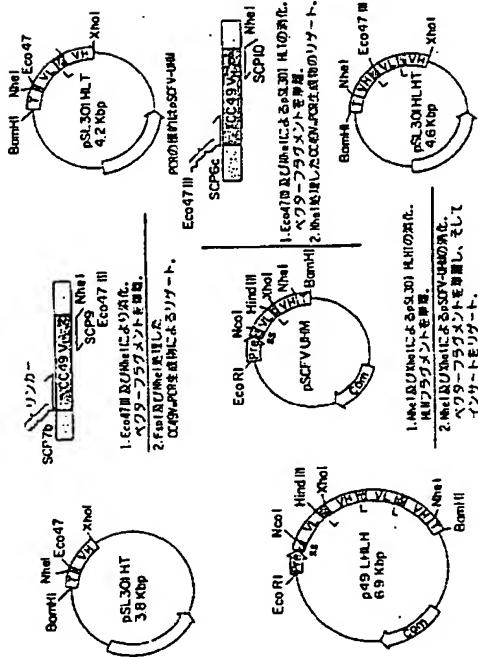
抄録(内容に変更なし)

FIGURE 9



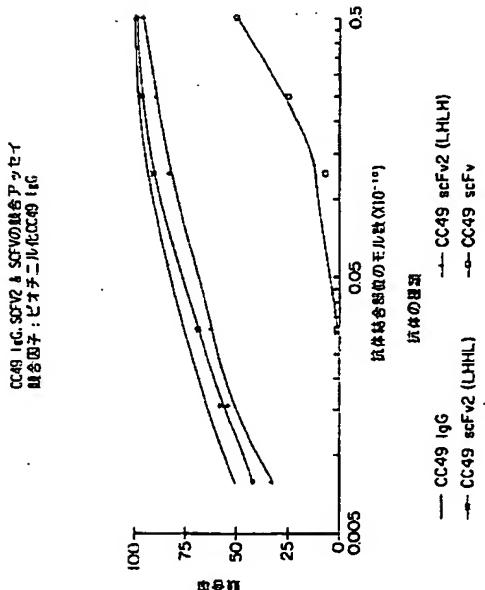
抄録(内容に変更なし)

FIGURE 10



抄録(内容に変更なし)

FIGURE 11



手 挑 捕 正 曹 (方式)

特表平7-503622 (16)

國 民 朝 五 雜 誌

— * —
PETAS SW1203

平成6年9月1日

特許局長官 高 鳥 章 記

3. 事件の表示

PCT/US93/12039

2. 采用的名族

多筋の一木脚竹体

3 修正版古語考

最佳との関係

名稱 第 23 卷之九
內容

4 代 四 人

住所：〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目8番15号 虎之門ヒルズ

常熟市服装有限公司 电话: 3594-0731

姓名：李明杰

第三章 会員の品性

卷四十一

卷五

八 附錄

- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
- (2) 図面の翻訳文
- (3) 委任状

7. 精正の内容

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の添書（内容に変更なし）
(2) 証面の翻訳文の添書（内容に変更なし）
(3) 証面の添書

Examination Report		Examiner's Name PCT/US 93/12039
Category	Character of invention, and evidence, most appropriate of the following paragraphs	Document No. where file
Y	<p>BIOCHEMISTRY</p> <p>vol. 30, no. 42 , 22 October 1991 , EASTON, PA US pages 10137 - 10125</p> <p>R.W.PANTOLIANO ET AL. "Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in <i>Escherichia coli</i>" cited in the application see page 1C120, column 1, paragraph 2</p>	2,4
X	<p>EP,A,D 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4</p> <p>-----</p>	1,6
P,X	<p>WO,A,93 11161 (ENZYME, INC.) 10 June 1993 see figure 19A</p> <p>-----</p>	1,9-5

国際調査報告		PCT/US 93/12039	
Patent document used in search report	Publication date	Patent history (number)	Publication date
WO-A-9107733	28-12-91	AU-A- 7883191 EP-A- 0488652 GB-A- 2250993 JP-T- 5502339	07-01-92 27-05-92 24-08-92 16-04-93
EP-A-0506124	30-09-92	AU-B- 6408463 AU-A- 1299292 JP-A- 5117154	08-09-93 15-10-92 14-05-93
WO-A-9311161	10-06-93	AU-A- 3178993	29-05-93

フロントページの続き

(51) Int.Cl.
C 0 7 K 16/46
C 1 2 N 15/09
//(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:19)
識別記号 庁内整理番号 F I
ZNA 8318-4H

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//(C12P 21/08

C12R 1:19)

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 紙 摘 正 古

明 類 古

平成9年7月2日

多様の一不純抗体

特許庁長官 龍井高光

1 事件の表示

平成6年特許出願第514437号

2 補正をする者

事件との関係 告訴出願人

名前 ヴィダウ ケミカル カンパニー

3 代 表 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 成ノ内ビル

有和株式会社事務所 電話 03-5470-1920

氏名 安田士(アシタ)石井 駿

4 並並列参考文献名

明細書及び請求の範囲

5 明細書項目名

明細書及び請求の範囲

6 並並列の内容

(1) 明細書を別紙の通り補正します。

(2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。

7 本件書類の書類

(1) 明細書 1項

(2) 請求の範囲 1項



本明細は、本願の多様抗体に関する。

抗体は、身体が外木様であると判断する特定の抗原又は物質に応答して免疫系により誘導されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスの上、抗体があり、各クラスに同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四鎖体、又はその結合体であり、結合と互鎖とよりそれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。結合は、一本の可変(V)、ドメインと、一本の定常(C)ドメインとより成り、一方、定常は、一本の可変性ドメインと、一本以上の正常ドメインとより成る。結合及び重鎖の両者に由来する、それぞれVと及びCと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの局在性を決定し、他方、定常(C)ドメインは複数のエフェクタ、機能をもたらす。

アミノ酸配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相補性決定領域(DR)を含んで成ることを示す。このDRは可変領域ドメインの構造保存性を維持するものと考えられている。このDRは各々の員の結合性異性によって型であります。且つ抗体の結合の多様性の範囲であると既定されている。

抗体の基本構造は、一本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、1gGクラスは、一つのVの抗原結合部位を有しており、他方、五量体1gMクラスは、五つのVの抗原結合部位を有している。

同一の遺伝子列及び結合性異性を有するモノクローナル抗体は許可及び治療用の両方として開発とされている。モノクローナル抗体は、選択された手順に従い、マウスのリンパ母細胞マウスミエロマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより正常に増殖される。しかしながら、ヒトにおけるインビオ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒトを免疫により誘導されるヒトマウス抗体混合に並づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の群に由来する抗体の場合は可変領域が別の群に出

Tecator Devices Corporation, Nash Park, CA)を用い、101~150 nmまでの光電子倍速キャビングにより測定した。scFv2の場合、発生の試料低下を伴うドガチニル化CCDの場合の低下をもたらした。

SBS-PAGE及びクエスチョンブロッティング

SBS-PAGE分析のためのサンプル (20 µl) を、赤青云母サンプル更張バッファー-Sepagel 1 (Integrated Separation Systems, Milpitas, CA) つゆで5分間煮沸することにより崩壊し、そして0~20%勾配のボリソクタリアルアミド (Biorad) で電気泳動にその変遷を仕様書 (155) に従って載せた。

電気泳動は、Biorad 2~6%装置 (155) を用い、ゲル当り50mAで、一一定の電流で約75分間した。ゲルをクマグーブリソクタリアルアミド (Biorad, Richard, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準は子孫が認められており (Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた：ホスホリーゼ、グルタメートヒドロゲナーゼ、オバルブシン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、酸酵アンヒドロゲナーゼ、ヨーラクトグロブリソクタリアルアミド、C。対応の分子量はそれぞれ65,600, 55,000, 43,000, 38,000, 28,000, 18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリケートのゲルを用意した。電気泳動後、ゲルの一方を過酸化バッファー (10.3Mのトリス-HCl, pH 6.4) の中で15~20分煮沸にした。Imobilon P PVDF (ポリビニリデンアクリロリン) 膜 (Millipore, 3 Miller, MA) をメタノールで2分煮沸し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に障壁バッファー (10.3Mのトリス-HCl, pH 6.4) の中で3分煮沸にした。Milliblot-SDE 装置 (Millipore) を、ゲルの上のタンパク質をこの膜に写せるために用いた。一滴の陽性バッファー (1) を障壁電極の中央に塗りた。Whatman 3MM 紙膜のシートを障壁バッファー (1) の中に浸し、そしてその毛細効果の上に滑らかに塗いた。障壁バッファー (1) (35mMのトリス、pH 6.4) の中に浸した別の毛紙を一晩の上に載せた。次に煮沸したPVDF膜を加え、半面ゲルをその上に重ね、そして反対に過酸化バッファー (10.3Mのトリス-HCl, pH 6.4) の中に浸して過酸化バッファー (1) を加えることによってランドイッテを作った。毛紙は250mM の定電荷液 (初期電圧は8~20ゲルトに筋歛した) を用いて30分で透せられた。

プロットした後、その膜を水の中で乾燥にすすぎ、そして2mlのブロッキング液 (トリス緩衝食塩水 (TBS) 中の1%の牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, St. Louis, MO)) を有する皿の中に入れた。TBS はFisher Chemical (Rockford, IL) により、チリ井水を水として購入し、50mlの水を加えたとき、その濃度ではBSAのトリス、0.15Mの塩化ナトリウムを含み、pH 7.6を示す。これらの液を毎日1回は、冷蔵室でブロックし、そして2ml (2つ) の0.5%のツイーン20洗浄液 (TBS) を用いて5分間は回転した。TBSを濾過するには、0.5ml のツイーン20 (Sigma) をTBSのリッター当たり混合した。使用したブローブ抗体は20kDaのオキニル化CCD 14本をとした (10kDaの抗体バッファー)。抗体バッファーは100mlのTBS当り1gの BSAを加えることにより作った。冷蔵温度で30~60分ブロープした後、その液を上記の過酸化バッファーに回転した。

次に、その液を冷蔵温度において30~60分、抗体バッファーの中で1:500 倍率のアルカリホスファターゼを有されたストレートアビジン (Boehringer Bio-technology Associates, Biologics, NJ) 20ml とインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この操作を繰り返した。先述洗浄の前に、液を複数アルカリバッファー (2ml) の中で2分煮沸した。このバッファーは0.1Mの塩酸水素ナトリウム、1mlのZnCl₂、H₂O. pH 8.8とした。アルカリホスファターゼにとっての最適を作るために、エトロブルーデーラゾリクム (E37) クロリド (Sigma, Sigma) を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-1-クロロ-3-インドイドナスフェート (EDC) (25mg, Sigma) を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-1-クロロ-3-インドイドナスフェート (EDC) (25mg, Sigma) を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの液を用い、Promegaカラクターゼ (Promega Protein A Affinity Column (Promega, WI) を用いて精製した。

ビオニカル法 PAGE

PAGE (14) は、CL49に對して特異的な、ATCC No. CEM1025として販売されているホスミの抗-イディオオタクア抗体 (162a, K.アイソクイップ) である。PAGEはSigma Lyse Protein A Affinityカラム (Promega, WI) を用いて精製した。

他のプロトコールにあったが、ただし石墨バッファーとして0.1Mのクニン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。固分を1.0Mのトリス-HCl (pH 9.0) を用いてpH 7.0に中和した。ビオニカル化CCDはドリカの通りに設定した。PAGE (4% ac, 水の中で100µl) を100µlの0.1MのZnCl₂、pH 9.8と合せた。ビオニカルe-アミノカプロン酸-ヒドロキシシタニミドエチル (Bio-Rad, X-115) (GibcoBRL, LaJolla, CA) (3.5ml) を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Bio-Rad X-115S 滴液 (20µl) をPAGE 14%ゲル液に加え、そして22でよく均成液をさせた。過剰のビオニカル化CCDは不純物を、Flameless Separation 12.40J/ACカラム (PerkinElmer, NJ) を用いてゲル通過により除去した。0.8% acのゲルで、ビオニカル化PAGE 14は16.8mlのピークで出現した。このピークを構成する両分をブールし、そして4°Cで保存し、そして-20°Cに。及びYACによって決定されるCC49イディオタクアを検出するのに用いた。

電気泳動 (pI)

電気泳動 (pI) は、Bio-Rad (Madison, WI) を介して入手できる PROTEIN-PAGE (pI) という名のコンピュータープログラムを用いて測定した。入力してある配列によるアミノ酸配列に基づき、時に加えて細節が得られた。pIは既に非常に寄与するため、pIについての計算はすでに測定し、なぜならそれらは全てグローブフィド結合に図示するからである。

実験的には、Imagelアグロース IEPブレーブ、pH 3~10 (ICG Instruments, Rockland, ME) を用いて決定した。Biorad Bio-plexesis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ゲルト (密度)、20mAの電流及び13Wの定電力とした。電気泳動は90minで完了した。IEP装置はBioradより購入した。そのキャットはフィヨシアニン、オーラクタグリオリンB、牛血清アンチドローザ、ヒト血清アンチドローザ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3-レンチルレクチン及びチトロームCを含み、それとのpI値は1.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00及び8.20及び9.50である。ゲルを、IEPにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体特の定性

IEP scFv2の上および単離体 (1)を含む複数のCC49抗体はすべて、由来している1.0ml走路板の石英板キュベット (Bellco社) およびPerkin-Elmer 0747HLS 分光光度計350nmを用いて、タンパク質吸収波長の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数 (E₁) は、各抗体について、ト式を用いて算定した。

$$E_1 = (Trp \text{ mol}) \times 3.500 + (Tyr \text{ mol}) \times 1.340 - ((Ox) \times 2.0) \times 150 - (Phe \text{ mol}) \times 16$$

これらの値は、F. B. Wallenauer, Advances in Protein Chemistry, 17版, 375~378頁に記載されている情報にもに基づいている。

酸性溶液液クロマトグラフィー

IEP scFv2を精製するために行った高性能液相クロマトグラフィーにはすべて、全體にチタン柱はチラボンP (PicoTag) を用いた IEF EPLC システムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2150型洗浄器、270nmの吸光度に設定されたUV CON 400 2238 装置出装置およびCC1型 Separac fraction collectorTM構成されている。

サブニュートのIEPによる精製

ガリメラーゼ活性度 (OD) はすべて、150ピングラム (pt) のプラスミド標的 (pGKSVIIN) : 100ピコモルのプライマー: 1.21%Perkin-Elmer-Cetus社 (米国)、コネティカット州、ノーウォータン所在の PEG11TM の Ampli-Tagタリマーゼ: 1E₁の 10mM dNTPおよび10µLの10×緩衝液 (両者ともに PEGキットに提供されている) : ならびに合計容積を 100µLにするに十分な水で構成された反応液を用いて行った。PCR反応はターマーが記載しているとほとんど同様にして行った。これらの反応は、PCR 6000ターマーサイクル (thermocycler) を用いて30サイクルを行ったが、その1サイクルは、94°Cで20~45秒間の DNAの煮沸; 52~60°Cで0.5~1.5分間のアニーリングおよび72°Cで0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社 (米国) カリソミルニア社、オスター・シティ所在の 333M型もしくは 581型 PCR合成装置で合成して上記のようにして用意した。

リゲーション

100μlのベクター 領域および対照する；(1) 化学共晶の量のインゲート DNA を用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、カリフォルニア州、ラ・ハーバー市)のT4 DNAリガーゼキットを用い、Eco-R1の表示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容液20μl)は最初10°Cでインキュベートし、次いで一夜まで待機した。

既製品

形質転換は、300μlのStratagene社の大根菌(E.coli) AG1コンビケント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホール所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応液の組合(1～5μl)を用いた形質転換ステップの後、細胞は、洗浄を受けながらラムアプロス(LB) 中で37°Cで1時間増殖させ、次いで、pSC1902-p459RIBもしくはp459RIBに用いる20μg/mlのクロムフェニコール含有(CM20)ルリア液天にプレートし、またはプラスミドpSL301を含むするクローンもしくはpSL301由来のその他の構成物に用いる100μg/mlアンブリシン(AMP)のルリア液天プレート(LB-AMP)上にプレートした。

大根菌クローンのスクリーニング

細胞プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニプレッピングキットを用いて、太太王(selection kit)を用いて相当するため適切な選択を含むするプロセス用物から選択した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドを検査

pSL301およびpSL301と命名された2種のプラスミドを、多面の一本鉛錠体を形成するために構築した。pSL301を含むする細胞は、V₁-L-V₁-L-V₁...L-V₁で表すことができるオリガノドを生成した。ここでV₁とV₂はCCS9組合の位置と対応の可視部位であり、およびリンクマーク(L)は、FRT SEQ ID NO:5の配列を有する25個のアミ酸のリンクである。

Lys-Ser-Lys-Asp-Ala-Lys-Lys-His-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Ala-Asp-Ala-Lys-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys

pSL301を含むする細胞細胞は、V₁-L-V₁-L-V₁-L-V₁で表すことができる

オリガノドを生成した。ここでV₁とV₂はCCS9組合の位置と対応の可視部位であり、およびV₁は上記アミノ酸列を有するペプチドリンクマーである。

pCCMV-1.7-V₁-L-V₂ (pSL301)のスクレオチド配列 SEQ ID NO:7とアミノ酸配列 SEQ ID NO:8を図6に示す。(pCCMV-1.7-V₁-L-V₂ (pSL301)のスクレオチド配列 SEQ ID NO:7)およびアミノ酸配列 SEQ ID NO:8を図6に示す。

pSL301の出発点

pSL301の構造を図8に示す。パシラス・リヘニオルミス(paslius licheniformis)のベニシリオゾーゼP (pSP1) ターミネーターの置き、The 1およびEco RIで45分間消化することによって、pSC1902が含まれたプラスミドから抜出し、各分離を行った後、5%ボリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動させ、エタノールで洗浄させ、次に、同様に脱脂させたペプチドリンクマーク(pSL301)のペプチドを生成した。1920年6月21日付け出願の特許待合番号T955-665号に記載されている。たゞこの出願の表示事項は本件に適用するものである。段に、pSC1902は、catPプロモーターのスクレオチド配列：国特pat1倒置位：CC40Y、順位：Bnd倒置倒置位；25個のアミノ酸のリンク；国特Xba I倒置位：CC40Y、順位：Bnd倒置倒置位；25個のアミノ酸のリンク；およびPstI倒置位を含むしている(図8参照)。このcatPプロモーターとpcoPターミネーターは、Bentlerら、J.Biol.Chem. 256巻、12211～12215頁、1981年に記載されている。

上記のリゲーション反応の一環(3μL)を、LB-AMP(100μg天プレート上)にブリントし次いで、培地をさせたコンビケント大根菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。catPターミネーター、インナートを含むするオテンショナルクローンを、Pharmacia社(米国、マリランズ州、ガイサースバーグ所在)のTi QuickcloneTM DNA構造キットと、Bulmersら、Nucleic Acid Research 17卷、452頁、1989年に記載されているマイクロ板によるロニー定着法をともに用いてスクリーニングした。プローブは、pcatF-MboI-SmaIターミネーター/fragメント自身であるが、Quickprimeキットによって供給された指示によって最適化し

した。陽性プローブであり、かつSmaIとMboIによる消化由来の207bpの量産対照断片(図6に示す558～2185の塩基対(bp))を含むするクローンをpSL301と命名し、次いでpSL301に対するスクレオチド配列を含むするpSL301-RTを発表するに至った。MboI-SmaI-SmaIターミネーターをpSL301に組みし、次には、そのSmaIとEcoRIの位置の間のオリゴマーー領域中に組みするEcoRI倒置倒置ニンドクターレー部を除くためであった。このことは、EcoRI位置が、構造体中に各細胞V領域を配置するのにユニクである必要があるV₁とV₂の領域を接続するため設計された。各V領域がEcoRIとMboI部位に付加されると、EcoRIは各場合に破壊され、ユニクな断片が得られる。EcoRIは各細胞を除くため、ユニクな断片が得られる。

V₁領域は、EcoRIの結合としてpSL301 T4用い、オリゴの5' SCP-3'オリゴSCP5によってRTして作製した。SCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO:10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO:11)は次のとおりである。

SCP5: 5'-TAA CTC CAC GTT CAG TTC CGC GAC-3'

SCP5: 5'-TAA GCT AGC AGC GCT TAC TGA CGA GCT TGA TCA GCT-3'

下線をつけた部分はエンドスクレオチド制限部位を示す。

培養された V₁ DNAを、4万の PCR、熱可逆性、エタノールによる洗浄および20μL TAEへの溶解によって処理した。そのV₁配列を EcoIとSmaIの結合部位で消化し、同じDNA酵素で消化され受け、得られた pSL301ベクターに接するリンクマークとして用いた。各V₁のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピケント大根菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP(100μg天プレート上)にプレートした。(LB-AMP(100μg天プレート上)にブリントし次いで、太太王の配列検定を行って、(448)の配列を確認し、pSL301-RT中に正しいCC40Y配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドは

pSL301-RTとMboIおよびSmaI-FRTの両本を構成するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴを図9に示す。

pSL301SEQ(SEQ ID NO:12)およびCC40Y(SEQ ID NO:13)のオリゴスクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQ: 5'-YCC TCG GAT TAC CGA AGC TTA 3'

CC40Y: 3'-GAT GAT TTT AAA TAC ATT GAG 3'

実施例1 pSL301の構造

pSL301(5μg)を出発毛量として用い、これを Eco47位およびMboIで消化し、大さきのベクターフラグメントを精製した。CC40Y挿入シグメントは、5' オリゴとしてSCP5を用いかつ3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって得られた。SCP5のスクレオチド配列(SEQ ID NO:14)は下記のとおりである。

SCP5: 5'-TAA TGT GAA CAT GAC CGA AGC AAA GAC CGA CAT

CGC AAA AGC CAT GAC CGC AGC CAT CTT GAG GTT CGG TGG CAG CGC

TCT-3'

またオリゴ SCP5Bはリンクマークコードイング領域の一端(SEQ ID NO:14のbp 6～70)を有している。pSL301のCC40Y領域でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO:14中の577～60由来のものである。

下線をつけた配列は EcoI部位に相当する。得られた PCRインターーを精製し、EcoIとMboIで熱可逆性によってpSL301RT Eco47位-MboIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピケント大根菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP(100μg天プレート上)にブリントした。pSL301RTを生成物を示す正しい大きさの EcoI-MboIインサートを有する2種のクローンの配列をオリゴSCP5を用いて決定し、正しい型別(即：カクレオチド)124～1543を有する2種のクローンをその後の精査に用いるのに適んだ。SCP5のスクレオチド配列(SEQ ID NO:14)は下記のとおりである。

SCP5: 5'-TC ACT TTA CGT AAC ATG ATC T-3'

最終のリンクマーク-V₁ サブユニット(60134～6061 図7)は、5' オリゴの SCP5と3' オリゴの SCP5Bを用いかつ PCRの複数として pSL301 T4を用いて製造

した。SCP7のスクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

SCP7: 5'-TAA TCG GCA GAT GAC GCA AGC AAG GCA GCT AAA AAT AAC GAT
GCG AAG AAG GAT GAC GCG AGC AAG GAT CTC GAC ATT CTC AAG TCA GAG TGT
CC'

下記をつけたスクレオチドは EcoI 配列である。SCP7のスクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

SCP7: 5'-TAA ACC ATC 1AT TAA CCT AGC GAC
TAG CCT CCT CGC 3'

下記をつけた最初の一部は NheI 部位に相当し、もう一つの部は AATI 配列に相当する。SCP7のスクレオチド 76 はリンクアーモードし(図7のスクレオチド 1546~1632)、一方で、アーモードするスクレオチド 77~93 は図7の 1632~1653 に相当する。プライマー SCPBatt2、そのうえ、大さの左かいテール、NheI 開頭部位、終止シグナル、AATI 利用部位および V_o の各部の構成を含んでいます。EcoI と NheI による消化の後、この得られた (20) のインサートを精製して新規 pSL301HITベクターの KpnI と Eco47I 部位に連結し、代謝的クローリングを NheI と EcoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ(ELP2 (-) と SCP7)で配列が決定されて、pSL301HITを導入した後導入確認された。そのスクレオチド配列(SEQ ID NO: 20)は下記のとおりである。

49LFC (-) : 5'-CTG CTC GTC CCA CGC CAA G-3'

プラスミド pSL301HITを ThaI および NheI で消化し、精製し、得られた 1176 bp V_o リンカーベクターと ThaI で消化し、精製し、得られた 1176 bp V_o リンカーベクターと ThaI で精製して、SCP7 DNA に連結して pSL301HITを新規した。なおこの pSL7 DNA は同じ前駆野原で切断されたその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリガーゼンヌ生成物(4 プロセス部分)を用いてコンビテント大腸菌(大腸菌 Strageticus)を形質転換し、LacZ XET^R 基因プレートにてプレートした。正しい新規前駆野原を有するプラスミドを含有する新規クローンを、pSL301HITを含むさせるために選択した。pSL301HITは、CC49 多基一核抗体 scIV2: V_o -L-4c -L-5c -L-7c または CC49scIV2 (L4H1)の前駆プロモーターとスクレオチド配列を含んでいます。

りは次のステップで修正され、オリゴ SCPGC (SEQ ID NO: 21) の末端に 5 基の欠失を組込むことによって pSL301HITを新規した。

SCPGC: 5'-TAC GCG TGT GAT GTC TCA AGG GAC CCG CCA AAA
CGA CGA CGC CAA AAA AGAT GAT GCA AAA AGAT GAT GCA -3'
AGCTCTAGTCGACGATCTTCAC-3'

SCPGC中の下線をつけた配列は Eco47I 部位に相当する。この場合において、SCP6は 5' オリゴとして用いられ一方 SCP10は 3' オリゴとして用いられて、リンクアーモードセグメントが生成する。SCP10 のスクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)は下記のとおりである。

SCP10: 5'-TGT TCG TAG CCT TTT ATG AGG AGA CGG TWS
CTG AGG TT 3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のスクレオチド 1938~1953に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCRシナプトは NheI だけで消化されやすいと精製される。ベクター pSL301HIT は Eco47I 部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化されやすいと精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部(3 μL)を用いてコンビテント イー・コリ大腸菌を形質転換した。この新規前駆野原を LB-AMP100プレート上にプレートし、正しい大きさの DNA を有する新規のクローンを得た。これらのクローンのうちの 2 個は、オリゴ pSL7 (-) および SCP7を用いて配列を決定した。そのスクレオチド配列(49LFC (-) の 19 と 20)は下記のとおりである。

49LFC (-) : 5'-GAG CAC TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図7のスクレオチド 1533~1653からの配列が確認され、正しい pSL301HITクローンを示した。

大腸菌で発現させるのに用いる量的なプラスミド pSL301HITを新規するため、pSL301HIT (5 μg) を KpnI と NheI で消化し、次いで 94.1-4c-L-7c 配列を有する小さい方のインサートを精製した。この新規を、pSL7 DNA (5 μg) を ThaI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製後と連結した。上記連結混合物の一剤 (4 μL) を用いてコンビテント大腸菌を

実験例2： PCR法による精製

pSL301HITの精製を図10に模式的に示す。リンクアーモードセグメントを用いたオリゴの SCP7と 3' オリゴの SCP7で新規した。

SCP7: 5'-TAA ACC ATC 1AT TAA CCT AGC GAC

AGC AGC AGC TGT CCT G-3'

SCP7ベクター (スクレオチド 3~76) は図6のリンクアーモードセグメント (スクレオチド 1124~1182に相当する) および図6の V_o のスクレオチド 1193~1215に相当する。PCRにおける pSL7 DNA (スクレオチド 77~93) にアミニした。

SCP7、NheI 部位(第一の下線をつけたスクレオチド)と Eco47I 部位(第二の下線をつけたスクレオチド)を有し、これらの部位は次の V_o 領域を有するため pSL301HITを作るのに必要な酵素部位である。SCP7のスクレオチド 16~28は図6のスクレオチド 1532~1557 (リンクアーモードの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方スクレオチド 21~46は、PCRにおける SCP7 (SEQ ID NO: 19) のアミノ酸領域である図6に示すスクレオチド 1509~1530に相当する。プラスミド pSL301HITを Eco47I と ThaI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、すみ ThaI と NheI で処理され精製された。PCRからのリンクアーモードベクター (Oligo DNA インサートと通路を示す。PCRからこのリンクアーモードベクター (Oligo DNA インサートと通路を示す。その連結混合物 (3 μL) を用いて大腸菌 AG1 コンビテント細胞を形質転換し、次いで正しい ThaI と NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ pSL7 (-) を用いて決定した。そのスクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

5'-TTC ATC ACC AAG TGA CCT TAC G-3'

配列決定の結果は、得られた pSL301HIT クローン中に PCRの誤まりと欠失があるということを示した。図6にみられるスクレオチド 1533~1537に相当する 5 個の塩基の欠失がみとめられ、そして T であるべきはずのスクレオチド 1531は NheI 部位のデータから新規したところ非常に似合っていた。得られた配列は、

5'-GAG CAC TAT TAT AGC TAT-3'

ここで下線をつけた配列は偶然に Eco47I 部位に相当した。図6の SCP7の配列はスクレオチド 1530、1531、1532、1533、1534および 1535に相当する。このまま

細胞を形質転換した。得られた形質転換細胞を L-1500B プレート上にプレートし、次いで pSL301HITに対する代数的なクローリングを、正しい精製供試物(図10を参照)と比べて TAE 7% 对する生物学活性に基づいて算出した。

実験例3： CC49-L7-4c-L-7cとL1500Bの共有結合した大腸菌の精製

CC49の共有結合した一本鎖二重体 (scIV2) の精製を行うために、大腸菌のベリプラズマ細胞質の蛋白を、pSL301HITと pSL301Lの両者の 1.5L の一液培養物から精製した。精製すると、精製物を 20Gel 2つの 1/50 分割に分離し、Servall GS-3 ローテー 10 分間 5000 rpm で回転分離した。ベレット化した細胞を灰度し、Sigma RCI を含有する 1938 リス-RCI (由 7.5% からなる 100 mL) に再溶解させた。精細を再びペント化し、合計 100 mL の 20% リス-RCI (由 3%) を灰度し、そして一つのチューブにブレードした。このチューブに、10W/vol のスクロースを含有する 20mM トリス-251 pH 7.3 (100 mL) および 10mM EDTA (由 1.5% (2.0 mL)) を添加した。得られた蛋白質を、時々振盪しながら、氷蓋に 10 分間保持した。高活性細胞 (10⁸ periotic cell) を有記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを 20mL の氷冷 0.5mM RCI 中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に 10 分間保持した。その細胞を有記のようにしてペレット化し、大腸菌の表面粗粒質の蛋白を有記の上部を上部に置き、0.2% (w/v) NlaIII (米国、ニューヨーク州、ロッカスター研究所) の過剰使用で処理することによってさらに高活性にし、次いで Falcon社 (米国、マサチューセッツ州、デンバーバス研究所) の Test-tube 30およびCentrifuge 30で 1.0 mL より小さい容積まで濃縮した。

pSL301HITまたは pSL301Lのクローン由来の粗細胞質蛋白のシャート (short late) を、Pharmacia社 (米国、ニューヨーク州、ビッグダラニ研究所) の Superdex 15 HR 10/30 (FPLC カラム (手め P35 でアセチル化されたもの)) に注入した。結合 IELISAで測定する場合、粗細胞質蛋白の生成物は 0.5aL/分の流量で 2~24 分間はあわせた。活性蛋白をブレードし、たとえたまうようにして希釈し、次に、システム 500 Microdialyzer Unit (Pierce Chemical社) を用い、粗細胞質蛋白を 3~4 日食えながら 80000 Kdカットオフ膜を用いて、20mM トリス-RCI (由 7.6) に対して一夜透析を行った。その試料を Pharmacia社のB35) 3 M2.5/5アクリオニカ試験FPLCカラムに注入した。粗細胞質として 20mM トリス-RCI (由 7.6) を用い、透析終日とし

特表平7-503622

て20Mトリス-BCI pH 7.6±0.5% (v/v) を含む均一プログラムを、1.5ml/minの流量で使用した。核酸の生成物は、試合 3LIS1液で測定する場合、各々3～4分弱から検出された。この時点の測定値、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマーシーリアントブルー-2250で染色し、他のゲルはウエスタン分析（プローブ抗体としてゴオチニル化 Fab 14を使用）で検されたが、scFv2(LILBまたはLILB)の総の計算分子量のオーバン（約、52.29ダラトン）の位置に出現した。活性蛋白は各蛋白濃度を、50μg/BSA pH 9.2に対して一夜過剰、次いで Phosphatase Gelsilane 5 ml/5カラム洗浄カラムに注射した。この洗脱スケジュールの開始の二つの蛋白のうちのうち、BSA Fab 2を含む LIS1液で測定する場合、活性蛋白が開始される前の段階に検出された。したがってこれらの部分は實際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで各分離と結合はさらに繰り返すためにブールした。

BSA 5カラムを活性蛋白 5部分について再び使用したが使用した後は約30%の活性-BCI pH 8.6であり、活性は0.8ml/minに低下させた。生底物にカラムとの結合なしで放出されたが、BSA 5に残っている不活性がわずかにあり、したがって分離は5～6分間かかった。この処理を行った後、生底物は再びアリーブの活性段階のために貯蔵した。

活性点選択
活性物の導出点（pI）は DNASTAR社（米国、ケンタッキーシティ、マディソン所蔵）のコンピュータプログラム Protein-Pi-Predictを使用して予測した。アミノ酸組成、頭より尾に並びて示した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社（米国、ノーンカ、ロックランド市）のSmart IEFブレード（試験用3～10を使用して測定した。上記IEFを実行するためには、Biorec社（米国、カリフォルニア州、リッキエンジニア所蔵）の電気泳動装置を、上記同一メーカーの指示にしたがって使用した。その結果得られた条件は、20mAで500V（設定）および一定電力の10ワットであった。等電点蛋白濃度は30分間で完了した。Biorec社のIEF標準品は、フィコシニアニン、タトタクトグロブリンB、ウシカルボニックアンヒドライゼ、ヒトカルボニックアンヒドライゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメンケチンおよびシクロム

シカキ有され、pI値はそれぞれ4.35、5.13、6.00、6.59、7.00、7.36、7.8、8.0、8.20および9.0であった。ゲルは IEFの指示にしたがって染色し観察した。DNASTARプログラムによって両者の scFv2の量の比として 5.1の値が示された。純品の生成物に対し单一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の C. Sの位置に示された。

IgG scFv2 (LILBおよびLILB)のような構造のIgG抗体は、280nm波長時の吸光度を分子量的に定義することによって定義した。モル吸光係数を。以降、光に適用した Weil-Wilson式を用いて測定した。

そのアノ酸組成に基づいて、CC49scFv2LILB CC49 scFv2LILB およびCC49scFv2のE₂₈₀（280nm）値はそれぞれ 1.49、1.63、1.63 および 1.71であった。

実験例

CC49scFv2の量のLILBとLILBの相対活性を、1gおよび以降実験でTAC-72ペプチドを用いる蛋白質scFv型と比較した。

ペーセント競合（percent competition）を下記式によって LIS1のデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合 - 試料組合量 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ組合 - 100%組合}} \times 100$$

「ゼロ組合 (zero competition)」値は、1:50 854からゴオチニル化CC49 (3×10～14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方 100%組合値はゴオチニル化CC49と混合した CC49の5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図1に示す。試料の吸光度値は 405nm～450nmで測定した。3回の測定よりの平均値を使用した。最初に試料 (25μl)を、TAC-72でコートしたマイクロリップルプレートに、1.0×10.10 ナルの結合濃度/μLで供給した。ゴオチニル化CC49 (4 μg/ml, 1:20,000は希釈、25μl 使用)で試料を1/2希釈で希釈した。連続希釈 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は 1:60 ではやや高い（図1参照）。別の試験で、CC49scFv2単体を Fabフラグメントと比較した。両者は一目であるが、これらは TAC-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、糸状結合の両者の活性は、二つの元分に

機能的な活性結合群をもっていることを示している。これに、両者の活性に比べて今 IEFについてられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49の状と同様に、免疫活性結合の活性であり、毛白血球過剰性の細胞と活性化した細胞の活性結合の活性を有することを示している。この活性によって、両者の scFv分子に比べて、本発明の化合物は多段階反応することができ、かつ活性結合に用いる免疫活性結合において活性化結合を高めることができることである。

本発明の他の実施形態は、本明細書を参考するかまたは本明細書に示されている範囲を実験することから、当該技術分野の専門家にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は試験だけを目的とするもので、本発明の他の適用範囲と意图は以下の実験の範囲によって示される。

以上

請求の範囲

1. 2以上の一量活性フラグメント、を含んで成り、各フラグメントが既界に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンクターを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンクターが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Pro Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Asp Asp Lys

Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして第二フラグメントは：

(a) 疏水可変ドメインを含んで成る第一ペプチド；

(b) 重合可変ドメインを含んで成る第一ペプチド；及び

(c) これ第一と第二のオリペプチドを機能的な結合性成分へと連絡しめる

第二のペプチドリンクター；

を含んで底を、多価の一本鎖抗体。

2. 前記活性結合群が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Lys Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Lys Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asp Tyr Leu Ala Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Itp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Prc Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Gln Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Lys

と実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記活性結合群が下記の配列

Glu Val Gln Ile Cys Gln Ser Asp Ala Cys Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala Ala Ile Ile Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Cys

Asn Glu Arg Phe Lys Glu Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
Ser Ser The Ala Tyr Val Glu Ieu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を示している、請求項1記載の多核一本鎖抗体。

5. 前記第一と第二のペプチドリンクーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多核一本鎖抗体。

6. 多核の一二重鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多核の一本鎖抗体が2本以上の一方鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが互にに対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一のペプチドリンクーを介して共に結合されており、そして各フラグメントは：

(a) 蛋白可変ドメインを含んで成る第一オリペプチド；

(b) 蛋白可変ドメインを含んで成る第二オリペプチド；及び

(c) この第一と第二のオリペプチドを親和的な結合部位へと連結せしめる第二のペプチドリンクー；

を含んで成る、DNA配列。

7. 前記第一オリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GGC ATT GTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTC TCA
CTT GGC GAG AAC GGT ACT TTG AGC TCC AAG TCC AGT CAG AGC
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCT TGG TAC
CAC CAG AAT CCT CCG CAG TCT CCT AAA CCT CTC ATT TAC TGG
GCA TCC CCT AGC CAA TCT CGG GTC CCT GAT CCT TTC ACA GGG
AGT GGA TCT CGG ACA CAT TTC ACT CCT TCC ATC AGC AGT GTC
AAG ACT GAA GAC CCT GCA CCT TAT TAC TGG CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCT CCT AGC TTC GGT GCT GGG AGC CCT CCT CCT CGG
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二オリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAG GTT CAG TTG CAG CAG PCT GAC CCT GAG TTG CTG AAA CCT
GGC GCT TCA CTG AAG ATT TCC TCC AAG GCT CCT GGC TAC ACC
TTC ACT CAC CAT GCA ATT CAC TCG TTG AAA CAG AAG CTC GAA
CAG GGC CTG CAA TCG ATT GCA TAT TTT PCT CCC GGA AAT CAT
CAT TTT AAA TAC AAC GAG TTC AAC GGC AAC CCC ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GNG CAC CTC AAC
AGC CTG ACA TCT GAG GAT PCT GCA GCG TAC TTC PCT ACA AGA
TCC CTC AAC ATG GGC TAC TGG CCT GAA GGA AGC TCA GTC ACC
GTC CCT TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。